



POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Auricularia fuscusuccinea* PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES COAGULANTES DE LEITE

Yasmim L. Santos¹; Joelly A. C. Delgado³; Danielle B. de Almeida²; Waldireny R. Gomes^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – PPGMBT/UEA

²Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica PPGIF/UFAM

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF/UFAM

Email: ysl.mbt26@uea.edu.br.

Palavras-Chave: Atividade coagulante, Cogumelos, Fermentação submersa.

Introdução

As enzimas coagulantes do leite desempenham papel fundamental na fabricação de queijos e outros derivados lácteos, pois promovem a coagulação do leite por meio da hidrólise da κ -caseína, influenciando diretamente a formação da coalhada, o rendimento do processo e as características sensoriais do produto obtido. A eficiência dessas enzimas é geralmente avaliada pela relação entre a atividade coagulante do leite (MCA) e a atividade proteolítica (PA), sendo desejáveis elevadas razões MCA/PA, que indicam alta capacidade de formação da coalhada com reduzida degradação das proteínas do leite (Shamtsyan *et al.*, 2014; Wiśniewski *et al.*, 2025).

Entre os coagulantes tradicionalmente utilizados, destaca-se a quimosina, obtida do estômago de bezerros e considerada referência na indústria de laticínios devido à sua elevada especificidade pela κ -caseína. Entretanto, o aumento da demanda mundial por queijos, associado à limitada disponibilidade do coalho animal e às restrições culturais, éticas e religiosas relacionadas ao seu uso, tem impulsionado a busca por fontes alternativas de enzimas coagulantes (Mamo; Assefa, 2018; Wiśniewski *et al.*, 2025).

Nesse contexto, as proteases de origem microbiana destacam-se por apresentarem elevada diversidade bioquímica, produção renovável, menor impacto ambiental e potencial para aplicações na indústria de alimentos (Sakovich, 2020). Entre os microrganismos produtores de proteases, os basidiomicetos vêm recebendo atenção crescente devido à capacidade de sintetizar enzimas com características tecnológicas promissoras para aplicação na indústria de laticínios. A atividade coagulante do leite já foi relatada em diferentes espécies de cogumelos, com enzimas que apresentam perfis variados de atividade proteolítica e especificidade pela κ -caseína, incluindo *Hericium erinaceum* (Sato *et al.*, 2018), *Pleurotus* spp. (Alecrim *et al.*, 2017), *Piptoporus soloniensis* (El-Baky *et al.*, 2011) e espécies do gênero *Auricularia* (Néstor; Dely-Rubí; Héctor, 2024).

Estudos demonstram que fatores como a composição do meio de cultivo exercem influência significativa sobre a produção de enzimas coagulantes por cogumelos, podendo alterar tanto a atividade coagulante quanto a atividade proteolítica dos extratos obtidos. Dessa forma, a avaliação de diferentes meios de cultivo constitui uma estratégia importante para identificar condições mais favoráveis à produção enzimática e ao aproveitamento biotecnológico dessas espécies. Apesar dos avanços observados, a caracterização de enzimas



produzidas por cogumelos ainda é limitada, especialmente para espécies nativas de regiões megadiversas, como a Amazônia, cuja biodiversidade representa uma importante fonte de recursos biotecnológicos ainda pouco explorados (Brito *et al.*, 2025).

Nesse cenário, espécies do gênero *Auricularia* têm sido apontadas como potenciais produtoras de proteases com atividade coagulante, além de apresentarem importância biotecnológica pela produção de compostos bioativos de interesse industrial (Zakaria *et al.*, 2022; Brito *et al.*, 2025). Assim, a investigação do potencial enzimático de espécies amazônicas pode contribuir para a prospecção de novas fontes de coagulantes microbianos, favorecendo o desenvolvimento de processos mais sustentáveis e a valorização da biodiversidade regional.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de proteases coagulantes por *A. fuscossuccinea* cultivada em meios à base de extrato de malte e Sabouraud, acrescidos de extrato de levedura, sob fermentação submersa.

Material e Métodos

Foi utilizada a espécie *A. fuscossuccinea*, cedida pela Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob o código de acesso 1959. A espécie foi reativada em placas de Petri contendo batata dextrose ágar. Os cultivos foram mantidos durante sete dias à temperatura ambiente (Batista *et al.*, 2024).

Após a reativação, a fermentação submersa foi realizada utilizando os meios extrato de malte acrescido de extrato de levedura (MEA + YE) e Sabouraud acrescido de extrato de levedura (SAB + YE), ambos com extrato de levedura a 0,5 % (p/v). Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio esterilizado a 121 °C por 15 min. Após resfriamento, foram inoculados cinco discos miceliais de 8 mm de diâmetro em cada frasco, sendo a fermentação conduzida em shaker a 150 rpm, a 30 °C, durante 21 dias (Batista *et al.*, 2024).

Ao término da fermentação, os extratos enzimáticos foram obtidos por filtração a vácuo em papel-filtro Whatman n.º 1, para separação da biomassa e obtenção dos extratos livres de células, utilizados nas análises enzimáticas subsequentes (Nóbrega *et al.*, 2021).

Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi analisada pelo método de Leighton *et al.* (1973). Foram utilizados como substrato 100 µL de azocaseína (1 % p/v), em 200 µL de tampão Tris-HCl (0,05 M), e 100 µL do extrato enzimático. O branco foi preparado nas mesmas condições da amostra-teste, substituindo-se o extrato enzimático pela solução tampão. As amostras foram preparadas em triplicata e incubadas por 15 min a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 800 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 20 % (p/v), seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 15 min. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 420 nm. Uma unidade (U) foi definida como o aumento de 0,1 na absorbância a 420 nm por hora.

Determinação da atividade coagulante



A atividade coagulante foi determinada segundo a metodologia descrita por Arima *et al.* (1970), com adaptações. Uma solução de leite desnatado a 10 % (p/v) foi preparada com CaCl_2 0,05 M e submetida à agitação magnética até completa dissolução. Uma alíquota de 5 mL da solução foi adicionada a tubos de ensaio, mantidos em banho-maria a 37 °C. Após 15 min, foram adicionados 0,5 mL do extrato enzimático. A formação do coágulo foi monitorada por até 40 min, registrando-se o tempo necessário para a coagulação do leite.

Uma unidade (U) de atividade coagulante do leite foi definida como a quantidade de enzima necessária para coagular 1 mL de substrato em 40 min a 37 °C. A atividade coagulante foi calculada de acordo com Arima *et al.* (1970), utilizando a seguinte equação:

$$U = \frac{S}{E} \times \frac{35}{T} \times \frac{2400}{t}$$

Onde:

T = temperatura do ensaio;

t = tempo necessário para formação do coágulo;

S = volume do leite (mL);

E = volume do extrato utilizado.

A razão coagulante (R) foi calculada pela razão entre a atividade de coagulação do leite e os valores de atividade proteolítica, conforme descrito na equação abaixo:

$$R = \frac{\text{atividade coagulante}}{\text{atividade proteolítica}}$$

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três fermentações independentes (n=3). O coeficiente de variação (CV) foi calculado para avaliar a variabilidade entre as fermentações. As médias das atividades coagulante e proteolítica dos diferentes meios de cultivo foram comparadas pelo teste t de Welch para amostras independentes, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Verificou-se que *A. fuscusuccinea* sintetizou proteases com atividade coagulante tanto no meio Malte + YE quanto no meio Sabouraud + YE (**Tabela 1**), demonstrando sua capacidade de produzir enzimas extracelulares com potencial aplicação na coagulação do leite. O meio MEA + YE apresentou maior atividade coagulante, com $184,37 \pm 9,00$ U/mL, diferindo significativamente do meio SAB + YE, que apresentou $156,32 \pm 5,16$ U/mL ($p = 0,016$). Por outro lado, a atividade proteolítica foi significativamente menor no meio SAB + YE ($0,023 \pm 0,0062$ U/mL) em comparação ao MEA + YE ($0,0816 \pm 0,016$ U/mL) ($p = 0,013$). Consequentemente, o meio SAB + YE apresentou maior razão MCA/PA (6796,52). Embora a atividade coagulante tenha sido ligeiramente inferior nesse meio, a elevada razão MCA/PA indica maior eficiência tecnológica, uma vez que altas relações entre atividade coagulante e



proteolítica estão associadas à formação da coalhada com menor degradação inespecífica das proteínas do leite.

Tabela 1. Atividade coagulante do leite e atividade proteolítica de extratos brutos obtidos por fermentação submersa de *A. fuscusuccinea*.

Meios de Cultura	Atividade Coagulante (MCA) U/mL	Coefficiente de variação (CV) %	Atividade Proteolítica (PA) U/mL	Coefficiente de variação (CV) %	Razão MCA/PA
Malte + YE	184,37 ± 9,00 ^a	4,88	0,0816 ± 0,016 ^a	18,98	2259,43
Sabouraud + YE	156,32 ± 5,16 ^b	3,30	0,023 ± 0,0062 ^b	27,15	6796,52

Nota: Valores expressos como média ± desvio-padrão de três fermentações independentes (n=3). Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste t de Welch (p < 0,05). A razão MCA/PA foi calculada pela divisão entre os valores médios de MCA e PA.

Fonte: Autoria própria, 2026.

Esses resultados corroboram os obtidos por Brito *et al.* (2025), que demonstraram que a composição nutricional do meio de cultivo exerce influência direta sobre a biossíntese de proteases por *A. fuscusuccinea*. Os autores observaram variações tanto na atividade proteolítica quanto na atividade coagulante em função do meio de cultivo, evidenciando que a disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio exerce papel fundamental na produção dessas enzimas. Embora as atividades coagulantes obtidas no presente estudo em MEA + YE (184,37 ± 9,00 U/mL) e SAB + YE (156,32 ± 5,16 U/mL) tenham sido inferiores às reportadas por Brito *et al.* (2025), as atividades proteolíticas foram substancialmente menores (0,0816 ± 0,016 e 0,023 ± 0,0062 U/mL, respectivamente). Como consequência, foram obtidas razões MCA/PA de 2259,43 para MEA + YE e 6796,52 para SAB + YE, valores que evidenciam uma relação favorável entre MCA e PA. Esses resultados sugerem que, nas condições experimentais avaliadas, o meio SAB + YE favoreceu a produção de proteases com menor hidrólise inespecífica das proteínas do leite.

Em estudo realizado com *A. auricula*, foram identificadas proteases com elevada atividade sobre caseína total e κ-caseína. Entretanto, os autores ressaltam que a elevada atividade proteolítica pode representar uma característica desfavorável para coagulantes destinados à fabricação de queijos, pois promove hidrólise excessiva das proteínas do leite (Néstor; Dely-Rubí; Héctor, 2024). Em contraste, *A. fuscusuccinea* apresentou baixa atividade proteolítica, especialmente no meio SAB + YE. Essas diferenças podem estar relacionadas às particularidades fisiológicas e genéticas de cada espécie, que influenciam o perfil de proteases sintetizadas, sua especificidade pelos substratos e sua regulação metabólica (Wiśniewski *et al.*, 2025). Assim, embora ambas as espécies pertençam ao mesmo gênero, os resultados sugerem que *A. fuscusuccinea* apresenta potencial como fonte de proteases coagulantes.

As razões MCA/PA obtidas neste estudo foram numericamente superiores às descritas para diferentes fungos basidiomicetos produtores de proteases coagulantes, incluindo *Pleurotus*



florida (31,59) (Bakr *et al.*, 2022), *Piptoporus soloniensis* (51) (El-Baky *et al.*, 2011), *Coprinus lagopides* (595,61) (Shamtsyan *et al.*, 2014), *Funalia* sp. (3473) (Gannochka *et al.*, 2019) e *A. fuscosuccinea* cultivada em outras condições (31,21) (Brito *et al.*, 2025). Esses resultados evidenciam que as condições de cultivo empregadas favoreceram a produção de proteases com elevada eficiência para coagulação do leite e reduzida atividade proteolítica, características desejáveis para aplicação como coagulantes microbianos na indústria de laticínios.

Além disso, Brito *et al.* (2025) destacam que fatores como disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, oxigenação e características genéticas da espécie influenciam a biossíntese de proteases. Embora o presente estudo tenha avaliado apenas o efeito do meio de cultivo, os resultados reforçam que a composição nutricional representa um fator determinante não apenas para a produção dessas enzimas, mas também para suas propriedades tecnológicas. Assim, os meios avaliados apresentaram perfis distintos, com meio MEA + YE favorecendo maior atividade coagulante e o meio SAB + YE apresentando menor atividade proteolítica e maior razão MCA/PA.

Conclusões

Conclui-se que *A. fuscosuccinea* é capaz de produzir proteases com atividade coagulante em fermentação submersa, sendo a composição do meio de cultivo um fator determinante para o perfil enzimático obtido. O meio Malte + YE proporcionou maior atividade coagulante, enquanto o meio Sabouraud + YE apresentou menor atividade proteolítica e maior razão MCA/PA. Esses resultados sugerem o potencial de *A. fuscosuccinea* como fonte de enzimas coagulantes e indicam que diferentes meios de cultivo podem favorecer perfis enzimáticos distintos. Estudos adicionais são necessários para otimização das condições de cultivo, caracterização bioquímica das enzimas e avaliação de seu desempenho na fabricação de queijos.

Agradecimentos

À CAPES, ao CNPq e à FAPEAM pelo apoio financeiro; ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – PPGMBT/UEA; e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM.

Referências

- ARIMA, K. *et al.* Milk-Clotting Enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. **Methods in Enzymology**. V. 19. P. 446-459. 1970.
- ALECRIM, M. M. *et al.* Produção e extração de coagulante do leite bovino utilizando o cogumelo *Pleurotus albidus*. **International Journal of Food Science and Technology**. Blackwell Publishing Ltd, 1 jan. 2017. Acesso em: 28 abr. 2026.
- BATISTA, S. C. P. Fabricação de produtos lácteos com proteases ácidas sintetizadas em condições de fermentação padronizada por *Lentinula* da Floresta Amazônica. Tese (Doutorado em Biotecnologia). **Universidade Federal do Amazonas**, Manaus, 2024.
- BAKR, A. *et al.* Purificação e caracterização da enzima coagulante do leite do cogumelo comestível (*Pleurotus florida*). **Cartas em Nanobiosciência Aplicada**, v. 11, n. 2, p. 3362–3373, 30 jun. 2022.
- BRITO, A. K. P. DE *et al.* Proteases from an Amazonian Mushroom Species: A Mycotechnological Alternative for the Production of Milk Coagulant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 197, n. 4, p. 2598–2609, 1 abr. 2025.



EL-BAKY, H. A. *et al.* PsoP1, a milk-clotting aspartic peptidase from the basidiomycete fungus *Piptoporus soloniensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 18, p. 10311–10316, 28 set. 2011.

GANNOCHKA, E. *et al.* Technology of obtaining milk-clotting enzyme from fungal culture *Funalia* Sp. for application in cheese production. p. 247–249, 2 maio 2019.

LEIGHTON, T. J., *et al.* The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**. V. 76, p. 103-122, 1973.

MAMO, J.; ASSEFA, F. The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. **Journal of Food Quality**, v. 2018, n. 1, p. 7957269, 1 jan. 2018.

NÉSTOR, G. M.; DELY-RUBÍ, C. H.; HÉCTOR, J. C. Coágulos do leite e atividade proteolítica do fungo *Auricularia auricula* e seu potencial na produção de queijo feta. **Journal of Nutrition**. v. 77, n. 1, jan. 2024.

NÓBREGA, Jordane Pimentel. Proteases de espécies de cogumelos comestíveis gelatinosos representantes da família Auriculariaceae Fr. ex Lindau (1897). 2021. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (Ciências Biológicas - Bacharelado) - **Universidade Federal do Amazonas**. 2021.

SAKOVICH, V. V. structural and functional peculiarities of aspartic proteases of basidiomycetes. **Biopolymers and Cell**, v. 36, n. 2, p. 87-98, 2020.

SATO, K. *et al.* Characterization of a milk-clotting enzyme from *hericium erinaceum* and its proteolytic action on bovine caseins. **Food Science and Technology Research**, v. 24, n. 4, p. 669–676, 2018.

SHAMTSYAN, Mark *et al.* Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. **LWT**, v. 58, n. 2, p. 343–347, 2014.

WIŚNIEWSKI, P. *et al.* Invited review: Milk-clotting enzymes of microbial origin and their role in cheesemaking—A review. **Journal of Dairy Science**. Elsevier Inc., 1 out. 2025.

ZAKARIA, M. K., et al. Nutriente composition, Antioxidant Activities and Glycaemic Response of Instant Noodles with Wood Ear Mushroom (*Auricularia cornea*) Powder. **Applied Sciences**, v. 12, n. 24, p. 12671, 2022.